

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL (A)
KOKAI PATENT APPLICATION NO. P2000-186046A

Int. Cl. ⁷ :	A 61 K 45/00 38/22 39/395 A 61 P 29/00 A 61 K 37/24
Filing No.:	Hei 11[1999]-292644
Filing Date:	October 14, 1999
Publication Date:	July 4, 2000
No. of Claims:	5 (Total of 10 pages; OL)
Examination Request:	Not filed

THERAPEUTIC AGENT AND DIAGNOSTIC METHOD FOR CHRONIC RHEUMATOID
ARTHRITIS

Inventors:	Shigeru Kotake 2-2-14 Josui Minamimachi Kodaira-shi, Tokyo Nobuyuki Udagawa 3-16-7 Akehara Kashiwa-shi, Chiba-ken Tatsuo Suda 1-8-5 Wakaba-cho Tachikawa-shi, Tokyo
Applicants:	000006699 Snow Brand Milk Products Co. Ltd. 6-1-1 Naeho-cho Higashi-ku, Sapporo-shi Hokkaido

000001856
Sankyo Co. Ltd.
3-5-1 Nihonbashi Honcho
Chuo-ku, Tokyo

Agent: 100090941
Seiya Fujino, patent attorney

[There are no amendments to this patent.]

Abstract

Problem

To present therapeutic agents and diagnostic methods for chronic rheumatoid arthritis

Means to solve

Therapeutic agents for chronic rheumatoid arthritis (RA) having substances that inhibit or neutralize the activity of interleukin-17 (IL-17) in the body and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 as active ingredients. Chronic rheumatoid arthritis diagnostic method by measurement of IL-17 content in blood or synovial fluid.

Screening method for substances that inhibit or neutralize IL-17 activity and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 that uses inhibition of differentiation to osteoclasts in coculture systems of osteoblasts or osteoblast-like stromal cells with myelocytes as an index.

Effect

Useful for medicines used in preventing and treating articular bone destruction in RA, etc., as an RA diagnostic method, and a screening method for finding substances effective in RA prevention or treatment.

Claims

1. Chronic rheumatoid arthritis therapeutic agents characterized by the fact that they have substances that inhibit or neutralize interleukin-17 activity and/or substances that inhibit osteoclastogenesis signal transduction of interleukin-17 as active ingredients.
2. Therapeutic agents described in Claim 1 that use interleukin-17-neutralizing antibodies as the substance that neutralizes interleukin-17.
3. Therapeutic agents described in Claim 1 that use osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) as the substance that inhibits osteoclastogenesis signal transduction of interleukin-17.

4. Diagnostic method for chronic rheumatoid arthritis characterized by the fact that interleukin-17 content in sampled blood or synovial fluid is measured and chronic rheumatoid arthritis is diagnosed by its numerical value.

5. Screening methods for substances that inhibit osteoclastogenesis signal transduction of interleukin-17 characterized by the fact that substances that inhibit or neutralize interleukin-17 activity and/or substances that inhibit osteoclastogenesis signal transduction of interleukin-17 are screened using inhibition of differentiation to osteoclasts in coculture systems of osteoclasts or osteoclast-like stromal cells with myelocytes as an index.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Technical field of the invention

This invention pertains to novel therapeutic agents for chronic rheumatoid arthritis that have substances that inhibit interleukin-17 activity, etc., as active ingredients, chronic rheumatoid arthritis diagnostic methods that measure interleukin-17 in blood or synovial fluid, and screening methods for substances used for said active ingredients that use coculture systems of osteoblasts, etc., with myelocytes.

[0002]

Prior art

Chronic rheumatoid arthritis (RA below) is characterized by proliferation of the synovial membrane in multiple joints and is a chronic systemic inflammatory disease in which deformation/destruction of joints and bone occurs over time. Although the causes of RA are as yet unclear, many cytokines participate in its pathogenesis and, of these, inflammatory cytokines such as interleukin (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are known to play important roles. Antirheumatic drugs are used for treatment of RA. Among these are antirheumatic drugs in the narrow sense and immunosuppressive drugs. For antirheumatic drugs in the narrow sense, for example, oral metal agents, D-penicillamine and bucillamine having SH groups, lobenzarit disodium, salazosulfapyridine, actarit, etc., can be cited. For immunosuppressive drugs, for example, there are methotrexate and mizoribine, and these fall in the category of antirheumatic drugs in the broad sense. Therapeutic goals using these antirheumatic drugs are to correct the immune abnormalities of RA and inhibit progress of the disease and to prevent bone destruction and functional difficulties. Thus, many antirheumatic drugs are being used clinically. But all of the drugs have adverse effects; many adverse effects such as interstitial pneumonia, and hematopoietic, renal and hepatic dysfunction have been reported. Moreover, although these antirheumatic drugs can seek to inhibit pain and arthritis and

improve QOL (quality of life), it is said that stopping systemic inflammation and articular function problems (bone destruction) is difficult. The development of antirheumatic drugs with few side effects that are effective in true RA treatment, particularly in inhibiting and improving articular function problems (articular bone destruction) is desired. Accurate diagnostic methods for RA and screening methods for RA therapeutic agents are also desired.

[0003]

In the pathogenesis of RA, various inflammatory cytokines, among them, cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- α , play important roles. Particularly with regard to IL-6, which is a typical inflammatory cytokine, RA treatment via inhibition of signal transduction by IL-6 has been tried. As methods for inhibiting IL-6 signal transduction, methods such as ① inhibiting IL-6 production, ② neutralizing IL-6, ③ inhibiting binding of IL-6 to IL-6 receptors, and ④ inhibiting binding of IL-6/IL-6 receptors with gp130 have been conceived. Concretely, as methods for inhibiting IL-6 signal transduction, RA treatment using humanized anti-IL-6 receptor antibodies has been tried and the possibility of RA treatment using humanized anti-IL-6 receptor antibodies has been suggested. Also, from the fact that humanized anti-IL-6 receptor antibodies are believed to inhibit promotion and activation of osteoclastogenesis by IL-6, it is anticipated that they will inhibit the progress of articular lesions.

[0004]

In recent years, interleukin-17 (IL-17 below) has been discovered and its function has been investigated (Rinsho Men'eki 29:678-682 (1997)). IL-17 is known to induce the production of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8 and GCSF in synovial membrane-derived fibroblasts and to induce differentiation of mature neutrophils. Recently, hypotheses that IL-17 participates in inflammatory diseases have also been formed. However, IL-17 is a novel cytokine derived from T cells and the participation of IL-17 in the pathogenesis of RA has not been made clear. Moreover, as stated below, many inflammatory cytokines, starting with IL-6, are known to have osteoclastogenesis-promoting activity by signal transduction mediated by gp130 and to have bone resorption-accelerating effects. But there has been almost no elucidation of the role of IL-17 in osteoclastogenesis.

[0005]

On the other hand, osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) was discovered as a factor that specifically inhibited in vitro osteoclastogenesis in culture fluids from normal human fetal lung-derived fibroblasts IMR-90 (ATCC CCL-186), and is a cytokine that was purified and isolated from these culture fluids (WO 96/26217; Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res.

Commun. 234:137-142 (1997)). Furthermore, the internal amino acid sequence of the isolated OCIF protein has been determined (Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 234:137-142 (1997)). Using DNA synthesized based on this amino acid sequence as a probe, human OCIF cDNA has been cloned from IMR-90 cDNA libraries. These human OCIF cDNA have been incorporated into expression vectors for animal cells. Transformed cells obtained by transfecting animal cells with these expression vectors have been cultured and gene recombinant human OCIF obtained from these culture fluids (WO 96/26217). It has been shown that administration of gene recombinant OCIF (rOCIF) caused marked improvement in bone density as well as bone strength in immobilized rats and ovariectomized rats (WO96/26217, Simonet et al.: Cell 89:309-319, 1997) and in administration to normal rats as well, caused marked increases in bone density and bone volume with decreases in the numbers of osteoclasts (Yasuda et al.: Endocrinology 139:1329-1337, (1998)). OCIF exists in the natural world as monomers (monomer type) and dimers (homodimer type). The molecular weight of monomeric OCIF is about 60 kd by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with and without reduction. The molecular weight of homodimeric OCIF is about 120 kd on SDS-PAGE without reduction and about 60 kd on SDS-PAGE with reduction. Human OCIF and mouse OCIF both consist of 380 amino acids and the homology between the two is 86%. Homodimeric OCIF is formed by intermolecular disulfide bonds due to cysteine residues that are 2nd from the C-terminus (Yamaguchi et al.: J. Biol. Chem. 273:5117-5123, (1998)). As for relative in vitro osteoclastogenesis-inhibiting activities, there are no differences between monomeric and homodimeric OCIF; they are equal. OCIF has 4 cysteine-rich domains in the N-terminus region. From their structural similarity, OCIF is a new member belonging to the TNF receptor (TNFR) family without a transmembrane (TM) region and is soluble. Moreover, in the C-terminus region of OCIF, there are 2 DD homologous regions (DHH) that have homology with regions that induce apoptosis (desdomains, DD) seen in Fas and TNFR-1, which are in the TNFR family. Furthermore, at the C-terminus, there is a region showing heparin affinity (Yamaguchi et al.: J. Biol. Chem. 273:5117-5123 (1998)).

[0006]

RA is a treatment-resistant inflammatory disease having synovial membranes as the principal lesions. Bone damage in RA is divided into ① bone destruction that occurs in diseased joints, ② osteoporosis that appears around the diseased joint from early in disease activity, and ③ systemic osteoporosis that gradually manifests with progress of RA lesions. In particular, osteoporosis around the diseased joints becomes symptomatic from early in this disease and it is known that the bone mineral density also decreases more rapidly than at other sites. RA is a chronic systemic inflammatory disease and many antirheumatic drugs consisting mainly of

anti-inflammatory agents, etc. are used for its treatment. As stated above, these antirheumatic drugs have diverse adverse effects and are said to have difficulty stopping bone destruction in RA. Although the causes of RA are as yet unknown, it has been shown that many inflammatory cytokines participate in its pathogenesis and that, among these, inflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1), IL-6 and TNF- α play important roles. This is also suggested from the fact that concentrations of IL-6 in synovial fluid show higher values than in osteoarthritis that exhibits articular symptoms similar to RA (Hirano, T. et al.: *Eur. J. Immunol.* 18:1797-1801, (1988)). In fact, toward developing more effective therapeutic drugs with few adverse effects, RA treatment mediated by interfering with cytokine signal transduction using humanized antibodies that neutralize the actions of these individual inflammatory cytokines or humanized antibodies to receptors for these inflammatory cytokines is being tried.

[0007]

Meanwhile, bone metabolism exists in the combined activities of osteoblasts that are in charge of bone formation and osteoclasts that are in charge of bone resorption. It is believed that bone metabolism abnormalities occur as a result of the equilibrium between bone formation and bone resorption being disrupted. For diseases accompanied by abnormalities of bone metabolism, osteoporosis, hypercalcemia, Paget's disease of the bone, renal osteodystrophy, RA, osteoarthritis, etc., are known. The articular bone destruction in RA is said to occur as a result of abnormally accelerated bone resorption. Acceleration of bone resorption is believed to occur by acceleration of formation of osteoclasts that are in charge of bone resorption and of bone-resorbing activity. Consequently, preventing and/or treating articular bone destruction in RA is specifically inhibiting this abnormally accelerated bone resorption, that is, inhibiting (suppressing) osteoclastogenesis, and/or inhibiting (suppressing) bone-resorbing activity of osteoclasts. Substances having such effects are anticipated as more effective antirheumatic drugs with few adverse effects.

[0008]

The cells in charge of bone metabolism are osteoblasts and osteoclasts. These cells interact with each other intimately and this phenomenon is called coupling. It is known that, by intercellular adhesion to osteoclast precursors and mature osteoclasts, osteoblasts/osteoblast-like stromal cells control osteoclast differentiation and maturation, and bone-resorbing activity of mature osteoclasts, respectively. A hypothesis is advocated (Suda et al.: *Endocrine Rev.* 13:66-80 (1992); Suda et al.: *Bone* 17:87S-91S (1995)) that osteoblasts/osteoblast-like stromal cells express osteoclast differentiation-inducing factor (ODF) on the cell membrane as a result of receiving signals from various bone-resorption factors through 3 different signal transduction

systems, that is, active vitamin D₃ mediated by D₃ receptors on the nucleus, interleukin-1 (IL-1), parathyroid hormone (PTH) and prostaglandin E₂ (PGE₂) by protein kinase A, and IL-6, soluble IL-6 receptors, IL-11, leukemia inhibiting factory (LIF) and oncostatin M, which are inflammatory cytokines, by gp130. As stated above, OCIF is a soluble receptor belonging to the TNF receptors, and has been found to bind specifically to active vitamin D₃-treated mouse osteoblast-like stromal cell line ST2 cells (Yasuda et al.: Endocrinology 139:1329-1337 (1998)).

[0009]

The cDNA of this OCIF binding molecule (OBM) that is expressed on membranes has also been cloned by expression cloning using ¹²⁵I-labeled OCIF (Yasuda et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3597-3602 (1998)). This OCIF binding molecule, OBM, is a membrane-bound protein and, from its biological activity test results, has been found to have activity as an osteoclast differentiation-inducing factor (ODF). (Yasuda et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3597-3602 (1998)). That is, OBM, as stated above, is an osteoclast differentiation-inducing factor (osteoclastogenesis promoting factor) that is expressed on osteoblast/osteoblast-like stromal cells as a result of various bone-resorption factors, including inflammatory cytokines, through 3 different signal transductions. The mechanism of action of OCIF has been found to be manifestation of osteoclastogenesis-inhibiting effects by binding of OCIF to this OBM (Yasuda et al.: Endocrinology 139:1329-1337 (1998); Yasuda et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3597-3602 (1998)).

[0010]

Problems to be solved by the invention

IL-17 is a novel T-cell-derived cytokine. Almost nothing about its role in osteoclastogenesis has been elucidated. The inventors discovered that there is an important relationship between IL-17 and RA pathology. Upon further study, the inventors discovered that inhibiting IL-17 activity and/or inhibiting signal transduction was linked to RA treatment, and that one pharmacological effect of OCIF was inhibition or neutralization of IL-17 activity and/or interference with signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17, and perfected this invention. They also discovered that if the IL-17 contents of blood or synovial fluid is measured, RA could be sharply distinguished from osteoarthritis, trauma or gout according to that content. Furthermore, they discovered a method for screening substances that inhibit or neutralize IL-17 activity or substances that inhibit the osteoclastogenesis signal transduction of IL-17 that used inhibition of differentiation to osteoclasts in coculture systems of osteoblasts, etc., with myelocytes as an index. Consequently, a topic of this invention is presentation of RA therapeutic agents that have substances that inhibit or neutralize IL-17 activity in the body and/or substances

that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 as the active ingredient. Another topic of this invention is presentation of a method for diagnosing RA by measuring IL-17 in blood or synovial fluid. Yet another topic of this invention is presentation of a screening method for substances that inhibit or neutralize IL-17 activity and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17.

[0011]

Means to solve the problems

This invention pertains to agents for treating chronic rheumatoid arthritis that have, as active ingredients, substances that inhibit or neutralize IL-17 activity in the body and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17. More concretely, for such substances, interleukin-17-neutralizing antibodies can be cited as substances that neutralize interleukin-17 activity and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) can be cited as a substance that inhibits signal transduction of interleukin-17 osteoclastogenesis. This invention also pertains to a chronic rheumatoid arthritis diagnostic method that measures the interleukin-17 content of sampled blood or synovial fluid and diagnoses chronic rheumatoid arthritis according to those numerical values. Furthermore, this invention pertains to a screening method for substances that inhibit or neutralize interleukin-17 activity and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17. This invention can be used as a medicine for preventing and treating articular bone destruction in diseases such as RA, and for RA diagnosis or in screening for substances that are effective in RA.

[0012]

Embodiment of the invention

According to the research of the inventors, as shown in the following application examples, it was found that IL-17 levels in synovial fluid showed significantly ($p < 0.001$) higher values in RA patients than in patients with osteoarthritis. It was also found that there were IL-17 positive cells in CD4+ and CD45RO+ T cells in synovial fluid from RA patients. Thus, it was suggested that IL-17 was deeply involved in RA pathogenesis. When the inventors then diligently studied the osteoclastogenesis-promoting effects of IL-17 to clarify the participation of IL-17 in acceleration of bone resorption, they discovered that IL-17 markedly induced formation of multinucleate osteoclasts from myelocytes in coculture systems of mouse myelocytes with primary cultures of osteoblasts and confirmed that it was deeply involved in RA pathogenesis, particularly articular bone destruction. From the above results, it was found that IL-17 was useful as a diagnostic marker for this pathology and was a useful index in screening for substances that inhibit its production or substances that inhibit signal transduction for RA therapy drugs.

Furthermore, it was inferred from the above that substances that inhibited or neutralized IL-17 activity or substances that inhibited signal transduction of osteoclastogenesis by IL-17 were promising as antirheumatic drugs. It has been possible to confirm that anti-IL-17 neutralizing antibodies and OCIF, which are such substances, inhibit osteoclastogenesis. In particular, it was discovered that OCIF markedly inhibited the pronounced osteoclastogenesis induction by IL-17. That is, it was found that OCIF completely inhibited osteoclastogenesis not only by the above inflammatory cytokines known to participate in RA pathogenesis that had been known previously, but also by IL-17 discovered in this invention. The inventors were the first to discover, as stated above, that IL-17 increased markedly in RA patients, that with the increase osteoclastogenesis was promoted and bone destruction was accelerated, and that such bone destruction was selectively inhibited by osteoclastogenesis inhibiting factor (OCIF).

[0013]

The inventors, as stated above, discovered that IL-17 levels in synovial fluid of RA patients showed significantly ($p < 0.001$) higher values than that of patients with osteoarthritis and, from the fact that it manifested bone-resorbing effects through marked osteoclastogenesis-inducing activity, that IL-17 was a cytokine deeply involved in disease changes such as articular bone resorption in RA. Moreover, they discovered from these results that if IL-17 activity in the body could be inhibited or neutralized and/or signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 could be inhibited, RA could be treated. Consequently, if drugs containing as active ingredients substances with IL-17 activity-inhibiting or -neutralizing activities and/or substances that inhibited signal transduction of osteoclastogenesis by IL-17 were used as RA therapy agents, RA could be treated. For such substances, substances such as the above substances that inhibit production of prostaglandin E₂ (PGE₂), substances that inhibit signals of PGE₂, antibodies that neutralize IL-17, or osteoclastogenesis inhibiting factor (OCIF) that inhibits signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 can be cited. IL-17 neutralizing antibodies and OCIF are used particularly favorably.

[0014]

In RA therapy agents of this invention that have antibodies that neutralize IL-17 activity, both monoclonal and polyclonal antibodies can be used for the active ingredient, IL-17-neutralizing antibodies. Although both human and murine can be used, humanized anti-human IL-17 monoclonal antibodies are preferably used. The antibodies can be manufactured by the following method. That is, polyclonal antibodies to IL-17 are obtained by immunizing rabbits or goats with pure IL-17 by the usual methods and purifying it from antisera obtained using Protein A columns (Pharmacia Co.). IL-17-neutralizing antibodies can be selected

using inhibition of IL-6 production when IL-17 is allowed to act on synovial membrane fibroblasts as an index. Commercially available neutralizing antibodies can also be used (made by R&D System Inc., etc.).

[0015]

Monoclonal antibodies to IL-17 can be manufactured as follows. That is, Balb/c mice are immunized by administration of pure IL-17. Hybridomas are created by cell fusion of mouse spleen cells with mouse myelomas by the usual methods, and hybridomas producing antibodies to IL-17 are selected. For the pure IL-17 which is an immune antigen, a commercially available product can be used or it can be produced by gene recombination methods using the already well-known IL-17 gene. By cloning the antibody-producing hybridomas obtained a few times (normally, about 3 times), isolated, stable hybridomas can be established. Antibody-producing hybridomas thus established are cultured and monoclonal antibodies against IL-17 can be purified from their culture supernatants using Protein A columns (Pharmacia Co.). For humanized antibodies, antibodies that neutralize human IL-17 activity and monoclonal antibodies having a high affinity (dissociation constants as low as possible, for example, less than 10^{-10} M) for human IL-17 are selected from among mouse anti-monoclonal [sic] antibodies obtained by the method described above.

[0016]

Humanizing is possible by then grafting (CDR-grafting) all of the variable regions (CDR) that are the antigen-recognition site of the mouse anti-human IL-17 monoclonal antibody obtained onto the variable region of human IgG. Or, transgenic mice in which the entire human immune system has been grafted into the mice are immunized by giving pure human IL-17. Spleen cells from said immunized mice are fused with mouse myelomas by the usual methods as described above and hybridomas are created. By purifying culture fluids of antibody-producing hybridomas using protein A columns, complete human anti-human IL-17 monoclonal antibodies can be obtained. By selecting antibodies that neutralize human IL-17 activity and antibodies that show a high affinity for human IL-17 from among the human monoclonal antibodies obtained, the human anti-human IL-17 monoclonal antibodies that are a goal of this invention can be obtained. The human anti-human IL-17 monoclonal antibodies that neutralize human IL-17 activity thus obtained can be used as RA therapy agents. The human IL-17 used as immunogen can be produced by genetic recombination methods from the well-known gene (Rouvier, E. et al.: J. Immunol. 150:5445 (1993)), or commercially available pure IL-17 can be used.

[0017]

In the RA therapy agents of this invention having OCIF as the active ingredient, products prepared by various methods can be used for the OCIF as long as they have been purified enough to be used as medicines. For OCIF preparation methods, for example, methods wherein primary culture cells or cell lines that produce OCIF are cultured and OCIF is obtained by isolation and purification from the culture supernatant (WO96/26217; Tsuda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 234:137-142 (1997)), methods wherein genes coding for OCIF are incorporated into appropriate vectors by genetic engineering methods, introducing these into appropriate hosts and assembling transformed cell lines, and obtaining the desired recombinant OCIF from the culture supernatants of those transformed cell lines (WO96/26217; WO96/20621; Simonet et al.: Cell 89:309-319, 1997), etc., can be cited. As for concrete methods for purifying OCIF from the culture supernatants of primary culture cells or cell lines, it can be purified by the usual protein purification methods, for example, chromatography using S-Sepharose or heparin Sepharose, gel filtration chromatography, HPLC using reverse phase columns, etc. (Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 234:137-142 (1997)).

[0018]

Alternatively, genes coding for the amino acid sequence of human OCIF can be inserted into animal cell expression vectors containing SR- α or CMV promoters using genetic recombination methods. These can be introduced into various host cells that have been used in the past in gene engineering methods, for example, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, yeasts, fungi, plant or animal cells, preferably, animal cells, for example, Chinese hamster ovary (CHO) cells, namalva [transliteration] cells, mouse C127 cells, monkey COS cells, etc. and it can be purified in the same manner from the culture fluids of the transformed cells obtained. The OCIF thus obtained can be modified forms wherein a portion of its amino acid sequence is missing or has been substituted with other amino acids or a portion of another amino acid sequence has been inserted, or modified forms wherein the 4 cysteine-rich domains present in the N-terminal region that are essential for activity have been preserved, but the entire C-terminal region has been substituted with another protein molecule, for example, Fc from immunoglobulins. Drugs containing OCIF thus obtained, that is, the drugs of this invention, can be used as agents for preventing and/or treating articular bone destruction in chronic rheumatism. Because OCIF in particular, in addition to inhibiting articular bone destruction by IL-17, also inhibits signal transduction of osteoclastogenesis and differentiation induction by IL-1, IL-6 and TNF- α , it is effective in a broader range of inflammatory RA.

[0019]

The RA therapy agents of this invention are safely administered orally or parenterally as medicines to humans or animals. When administering parenterally, for example, injections can be prepared by the usual methods. When making human IL-17-neutralizing antibodies or OCIF into injections, after dissolving in an appropriate solvent such as sterile water, buffer solutions, or physiological saline, they can be prepared by filtering with a filter and sterilizing and then filling aseptic containers. The antibody content of injection is normally about 0.001-20% w/v. Meanwhile the OCIF content is normally about 0.0001-5% w/v; preferably they are prepared at about 0.001-1% w/v. When using OCIF or antibodies as active ingredients, antibodies or OCIF content of the formulation can be adjusted as appropriate depending on the form of the agent and the disease for which it is used. When formulating, stabilizers and adsorption inhibitors are preferably added. For stabilizers, for example, albumin, gelatin, sugar alcohols such as mannitol and sorbitol, amino acids such as glycine and alanine, glucose, dextran, polyethylene glycol, etc., are used. For adsorption inhibitors, albumin, gelatin and nonionic surfactants such as Polysorbate 20 and 80 are used. For liquid formulations, frozen storage or removing the water content by lyophilization and storing is desirable. Lyophilized formulations are used by adding injection quality distilled water and redissolving at the time of use. The RA therapy agents of this invention are administered by the appropriate administration routes depending on the form of the agent according to the pathology of the disease to which they are applied. For example, intravenous, subcutaneous or intramuscular injections, or in prevention and/or treatment of articular bone destruction that is a characteristic of indicated diseases of these agents, they can be administered into the joint cavity. The dosages are adjusted as appropriate in these situations according to patient's symptoms, age or body weight. Because the half-life of humanized antibodies is normally very long (around 20 days), one need only administer 0.05-500 mg 1-2 times every 30 days. With regard to OCIF, on the other hand, its dose is 0.01-100 mg given once or divided into several times daily or as sustained release preparations, it need only be given 1 or 2 times in 7-15 days. When administering the therapeutic agents of this invention orally, they are formulated as, for example, tablets, granulates, microgranulates, powders, soft or hard capsules, liquid agents, emulsions, syrups, etc. These formulations can be prepared according to the usual methods.

[0020]

In this invention, RA diagnoses can be made by measuring the IL-17 content of sampled blood or synovial fluid. Normally, if it is 2 ng/mL or more, it can be evaluated as positive. To measure the IL-17 content, enzyme immunoassay kits (ELISA) or radioimmunoassay kits (RIA) that use IL-17 antibodies can be used. Both polyclonal and monoclonal antibodies can be used

for the IL-17 antibodies used in the IL-17 measuring reagents. The antibodies can be manufactured by the methods described above. By constructing an ELISA or RIA for IL-17 using as polyclonal antibody-polyclonal antibody, polyclonal antibody-monoclonal antibody, or monoclonal antibody-monoclonal antibody combinations, the IL-17 content of human serum and synovial fluid can be measured with high sensitivity. For RA patients, IL-17 in the serum and synovial fluid are characteristically increased and can be clearly distinguished from patients with osteoarthritis that are difficult to distinguish diagnostically from RA patients.

[0021]

As stated above, for osteoclastogenesis due to IL-17, IL-17 acts on osteoblasts/osteoblast-like stromal cells, prostaglandin E₂ (PGE₂) is produced, the signal by this PGE₂ is received again by the osteoblasts/osteoblast-like stromal cells mediated by protein kinase A, osteoclastogenesis differentiation inducing factor OBM is expressed on the surfaces of these cells and osteoclastogenesis is promoted. Consequently, using inhibition of differentiation to osteoclasts in coculture systems of osteoblasts or osteoblast-like stromal cells with myelocytes as an index, substances that inhibit or neutralize IL-17 activity and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 can be screened. Concretely, desired substances that neutralize or inhibit IL-17 activity and substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17 can be screened using osteoclastogenesis-inducing activity (tartrate resistant acid phosphatase activity: TRAP activity, or calcitonin receptor expression) by IL-17 in coculture systems of neonatal mouse cranium-derived primary culture osteoblasts with mouse myelocytes, or mouse spleen cells with mouse osteoblast-like stromal cell line ST2 as an index, adding test substances to these culture systems, performing culturing and measuring the above TRAP activity or calcitonin receptor expression, or more directly, observing osteoclastogenesis. Both TRAP activity and calcitonin receptor expression can be easily measured with high sensitivity using commercially available immunoassay kits as well as ¹²⁵I-labeled salmon calcitonin (made by Amersham). Substances that inhibit IL-17 activity or inhibit osteoclastogenesis promoting activity signals to osteoblasts/osteoblast-like stromal cell lines by IL-17, and substances that inhibit PGE₂ production are detected as substances that are positive in these screening systems.

[0022]

Application examples

This invention is explained in more detail using the following application examples. However, these are only for illustration and this invention is not limited in any way by these.

[0023]

Application Example 1

Inhibition of osteoclastogenesis by polyclonal antibodies that neutralize IL-17 activity

The effects of polyclonal antibodies that neutralize IL-17 activity on in vitro osteoclastogenesis-inducing activity by IL-17 were studied by the same method as Application Example 5. That is, in a coculture system of osteoblasts and myelocytes, IL-17 (1 ng/mL, gene recombination product, made by PeproTech EC Co.), active vitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃, 10⁻⁸ M, made by Wako Jun'yaku Co.), PTH (200 ng/mL, made by Asahi Kasei Co.), or IL-1 β (10 ng/mL, made by Genzyme Co.) was added as osteoclastogenesis inducing factor. 2.5 μ g/mL of polyclonal neutralizing antibodies to IL-17 obtained from the serum of goats immunized with IL-17 (gene recombination product, made by PeproTech EC Co.) were added in to culture systems containing IL-17. 5 μ g/mL of polyclonal neutralizing antibodies to IL-17 were added to culture systems with active vitamin D₃, PTH or PGE₂ added. Osteoclastogenesis was evaluated by fixing adherent cells in each well after 6 days of culture and then TRAP staining and counting the number of TRAP-positive osteoclasts. For TRAP staining, adherent cells were fixed for 3 min with 10% formaldehyde, the surface of each well was blown dry, then incubated for 10 min at room temperature in acetate buffer containing 0.01% AS-MS phosphate salt (Sigma Co.) as substrate and 0.03% red violet LB salt as the stain for the reaction product in the presence of 50 mM sodium tartrate. TRAP-positive multinucleate cells containing 3 or more nuclei were counted as osteoclasts. Individual experiments were repeated 4 times and the results obtained are shown in Figure 1. Also when calcitonin receptor expression was confirmed by autoradiography using ¹²⁵I-labeled salmon calcitonin (made by Amersham Co.) using the method of Udagawa et al. (Udagawa et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7260-7264 (1990)) to confirm that these cells were osteoclasts, they were confirmed to be osteoclasts. As a result of this, it was found that polyclonal neutralizing antibodies to IL-17 specifically inhibited osteoclastogenesis inducing activity of IL-17. As is clear from these results, polyclonal neutralizing antibodies to IL-17 inhibit articular bone resorption due to the IL-17 present in high numbers in RA synovial fluid and are useful as RA therapy drugs.

[0024]

Application Example 2

Inhibition of osteoclastogenesis by OCIF

The effects of OCIF on in vitro osteoclastogenesis inducing activity by IL-17 were studied by the same method as in Application Example 1. That is, in coculture systems of osteoblasts with myelocytes in the presence of IL-17 (1 ng/mL) as osteoclastogenesis inducing factor, OCIF was added to give concentrations of 1.5-50 ng/mL and they were cultured for 6

days. After completion of culturing, the number of TRAP-positive multinucleate cells (osteoclasts) were counted. Various experiments were repeated 4 times and the results obtained are shown in Figure 2. As a result of this, it was found that OCIF inhibited osteoclastogenesis by IL-17 dose-dependently and almost completely inhibited osteoclastogenesis at concentrations of 25 ng/mL.

[0025]

It has already been found that, for inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and IL-11 and known bone resorption factors including active vitamin D₃, PTH and PGE₂, their signals are transmitted to osteoblasts/osteoblast-like stromal cells mediated by 3 different signal transduction systems and that, on the surfaces of those cells, OCIF binding molecules (OBM) having osteoclastogenesis differentiation inducing activity is expressed (Yasuda et al.: *Endocrinology* 139:1329-1337 (1998)). From the fact that the osteoclastogenesis due to IL-17 that was newly found in this invention is also completely inhibited by OCIF, the inventors studied whether or not OBM expression is also induced on osteoblasts with IL-17 stimulation. The presence or absence of OCIF expression induction and the presence or absence of β -actin induction were also checked as a control. In the presence or absence of various concentrations of IL-7, NS398 (10⁻⁸ M), IL-1 β (1 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL) or active vitamin D₃ (10⁻⁸ M), mouse osteoclasts were cultured for 3 days. After culturing, northern blot analysis was performed using 20 μ g total RNA from said cells and OBM cDNA as a probe. The results are shown in Figure 3. Only OBM was specifically induced. As a result of this, it was found that, like IL-1 β , TNF- α and active vitamin D₃ that have already been distinguished as bone resorption factors, IL-17 acts on osteoblasts and dose-dependently promotes OBM gene expression. Moreover, OCIF induction was unrelated to the presence of these bone resorption factors. As a result of this, it was found that inhibition of IL-17 induced osteoclastogenesis by OCIF resulted from OCIF binding to OBM whose expression was induced on osteoblasts by IL-17, thereby blocking the osteoclastogenesis signal by OBM. From the above results, it was found that OCIF completely inhibits osteoclastogenesis promoting effects, that is, bone resorption effects by all cytokines, starting with IL-17, known to be deeply involved in RA pathogenesis. In particular, because OCIF inhibits osteoclastogenesis in response to the high values of IL-17 present in synovial fluid in RA, it is useful in RA treatment. Furthermore, because it has been seen that OCIF is a cytokine having high specificity as an osteoclastogenesis inhibiting factor and having very low toxicity (Yasuda et al.: *Endocrinology* 139:1329-1337 (1998); Mizuno et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:610-615 (1998)), it is promising as a very safe, highly effective RA therapy drug, particularly as a drug inhibiting bone resorption in joints.

[0026]

Application Example 3

Production of OCIF-containing formulations

There are 2 drugs of this invention, antibodies that neutralize IL-17 and OCIF. Generally, doses of antibodies for therapeutic purposes are relatively high compared to doses of hormones or cytokines and protein stability is also superior. For this reason, no problems occur even if known preparation methods are used. Consequently, regarding application examples in manufacturing formulations, OCIF formulations will mainly be cited. Of course, formulations having antibodies as active ingredients can be made similarly following the OCIF formulations in this application example. The substance used for OCIF formulation was a genetic recombination product.

Manufacturing Example 1

A solution containing 1 mg OCIF, 1 g sorbitol and 10 mg Polysorbate 80 in 100 mL of physiological saline was sterile-filtered. After aliquoting 1 mL each into sterile vials, lyophilized formulations were obtained by lyophilizing and sealing.

[0027]

Manufacturing Example 2

After dissolving 876.6 mg sodium chloride, 1 mg OCIF and 100 mg low molecular weight gelatin in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4), the volume was adjusted to 100 mL with said buffer. After sterile filtration and then aliquoting 1 mL each into sterile vials, lyophilized formulations were obtained by lyophilizing and sealing.

[0028]

Manufacturing Example 3

A solution containing 1 mg OCIF, 2 g mannitol and 10 mg Polysorbate 80 in 100 mL of injection quality physiological saline was sterile-filtered. After aliquoting 1 mL each into sterile vials, lyophilized formations were obtained by lyophilizing.

[0029]

Manufacturing Example 4

A solution containing 1 mg OCIF, 2 g glycine and 10 mg Polysorbate 80 in 100 mL of physiological saline was sterile-filtered. After aliquoting 1 mL each into sterile vials, lyophilized formulations were obtained by lyophilizing.

[0030]

Application Example 4

Measurement of IL-17 in synovial fluid of RA, osteoarthritis, trauma and gout patients

IL-17 concentrations were measured in synovial fluid from 43 RA patients (both men and women) and, as control patients, 9 osteoarthritis (OA) patients, 4 trauma (Tr) patients, and 7 gout (G) patients. The amount of IL-17 in the synovial fluids was measured according to the appended protocol using an ELISA kit (Biosource International Co.). The results are shown in Figure 4. As a result of this, there were many RA patients with high values for IL-17 levels in synovial fluid and a significant ($p < 0.001$) difference between RA and OA patients was seen.

[0031]

Application Example 5

In vitro osteoclastogenesis inducing activity of IL-17

Primary culture osteoblasts were prepared by digesting the crania obtained from neonatal mice (20 to 30) 5 times successively using 0.1% collagenase and 0.2% dispase. Meanwhile, mouse myelocytes were obtained from mature mice. Coculture of the osteoblasts with the myelocytes was performed by the method of Udagawa et al. (Udagawa et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7260-7264 (1990)). That is, using 48-well plates, primary culture osteoblasts (2×10^4 cells/well) and myelocytes (5×10^5 cells/well) were cocultured in 0.3 mL of α -MEM (made by GIBCO BRAL Co.) containing 10% bovine serum (FBS, made by JRH Bioscience Co.) and the test substance. For the various test substances containing IL-17, 4 culture wells were used and, on the 3rd day of culture, the medium was replaced with fresh medium.

Osteoclastogenesis was evaluated by culturing for 6-7 days, then fixing the adherent cells in each well, then TRAP staining and counting the number of TRAP-positive osteoclasts. For TRAP staining, adherent cells were fixed for 3 min with 10% formaldehyde, the surface of each well was blown dry, then incubated for 10 min at room temperature in acetate buffer containing 0.01% AS-MS phosphate salt (Sigma Co.) as substrate and 0.03% red violet LB salt as the stain for the reaction product in the presence of 50 mM sodium tartrate. TRAP-positive cells appeared blackish red. TRAP-positive multinucleate cells containing 3 or more nuclei were counted as osteoclasts. The results are shown in Figure 5. As a result of this, it was found that IL-17 had activity that induced osteoclastogenesis dose-dependently from osteoclast precursor cells (hematopoietic cells) and manifested this activity at low concentrations of 0.01-10 ng/mL. Moreover, from the fact that the osteoclasts induced by IL-17 formed countless bone resorption holes (pits) on ivory fragments, they were seen to be mature osteoclasts having bone resorption activity. Clearly, the significantly higher values of IL-17 in the synovial fluid of RA patients in Application Example 4 and the marked osteoclastogenesis inducing activity, that is, the

bone-resorption promoting activity of IL-17 in this application example suggest that IL-17 is deeply involved in RA pathogenesis. Consequently, IL-17 measurement reagents are useful as RA diagnostic chemicals.

[0032]

Application Example 6

Screening of substances that inhibit the vitro osteoclastogenesis-inducing activity of IL-17

With the same method as Application Example 5, IL-17, active vitamin D₃ or PGE₂ was added as the osteoclastogenesis promoting factor and, as the anti-inflammatory drug, indomethacin or NS398, which is a specific inhibitor of cyclooxygenase-2 (Cox-2), to coculture systems of osteoblasts with myelocytes and cultured for 6 days. IL-17 was added to give 1 ng/mL and active vitamin D₃ and PGE₂ to give 10⁻⁸ M and 10⁻⁶ M, respectively. 10⁻⁸ M were added for both indomethacin and NS398. After culturing, TRAP-positive multinucleate cells were counted. Various tests were performed 4 times and numbers of cells are expressed as the mean ± SEM. The results are shown in Figure 6. As a result of this, it was found that the osteoclastogenesis-promoting effects of IL-17 were specifically inhibited by indomethacin and Cox-2 inhibitors. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are indispensable in RA treatment. Specific inhibitors of Cox-2 are particularly anticipated as RA therapy drugs with few adverse effects. Thus, upon screening using inhibition of in vitro osteoclastogenesis by IL-17 as an index, compounds known in the past as RA therapy drug and compounds considered to be promising could be easily and correctly screened. Consequently, this invention is useful as a screening system for RA therapy drugs.

[0033]

Effects of the invention

Implementing this invention provides RA therapeutic agents that have, as active ingredients, substances that inhibit or neutralize IL-17 activity in the body and/or substances that inhibit signal transduction of osteoclastogenesis induction by IL-17, RA diagnostic methods that are characterized in that they measure IL-17 in the blood or synovial fluid, and screening methods for substances that inhibit osteoclastogenesis systems formed by IL-17. IL-17 is useful as an RA diagnostic marker and screening methods using osteoclastogenesis systems with IL-17 are useful as screening methods for RA drugs.

Brief description of the figures

Figure 1 shows the osteoclastogenesis-inhibiting effect of polyclonal antibodies that neutralize IL-17 activity in Application Example 1.

Figure 2 shows the dose-dependent osteoclastogenesis-inhibiting effect of OCIF in Application Example 2.

Figure 3 shows northern blot analysis results confirming that the various osteoclastogenesis-inducing factors and IL-17 expressed OBM in Application Example 2.

Figure 4 shows a bar graph displaying the results of measuring the IL-17 content of synovial fluid of rheumatism (RA), osteoarthritis (OA), trauma (Tr) and gout (G) patients by ELISA in Application Example 4.

Figure 5 shows that osteoclastogenesis is promoted dose-dependently by IL-17 in coculture systems of osteoblasts with myelocytes in Application Example 5.

Figure 6 shows that osteoclastogenesis induced by IL-17 is inhibited by NS398 and indomethacin in Application Example 6.

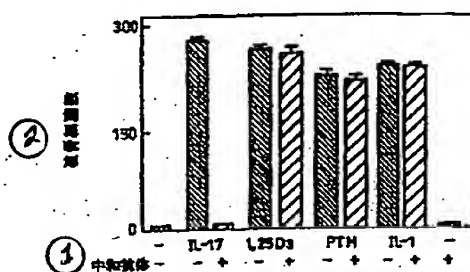


Figure 1

Key: 1 Neutralizing antibodies
2 Number of osteoclasts

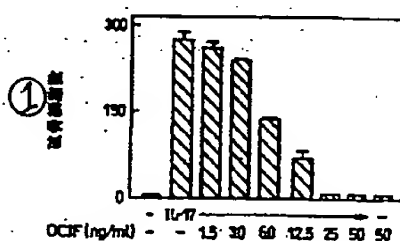


Figure 2

Key: 1 Number of osteoclasts

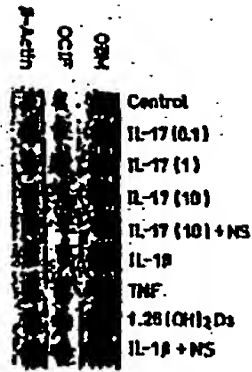


Figure 3

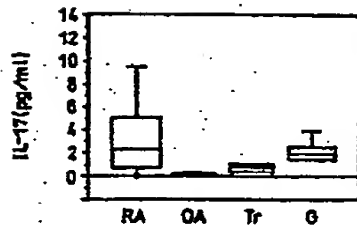


Figure 4

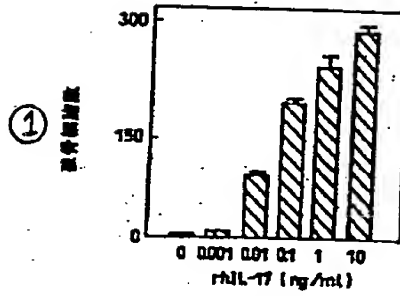


Figure 5

Key: 1 Number of osteoclasts

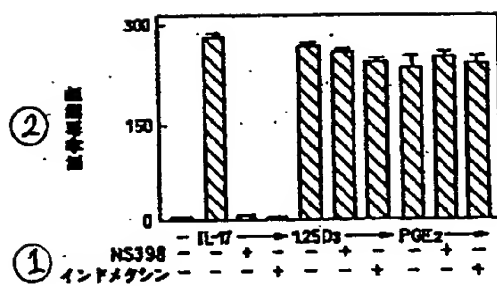


Figure 6

Key: 1 Indomethacin
2 Number of osteoclasts

1/34/1 (Item 1 from file: 345)
16168893
Basic Patent (No,Kind,Date): JP 2000186046 A2 20000704

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 2000186046 A2 20000704
Priority (No,Kind,Date): JP 99292644 A 19991014; JP 98307895 A 19981014
Applic (No,Kind,Date): JP 99292644 A 19991014
IPC: * A61K-045/00; A61K-038/22; A61K-039/395; A61P-029/00
CA Abstract No: ; 133(06)072949D
Derwent WPI Acc No: ; C 2000-551579
Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2001 EPO. All rights reserved.

1/34/2 (Item 1 from file: 347)
06600249 **THERAPEUTIC AGENT FOR AND DIAGNOSIS OF CHRONIC RHEUMATISM AND**

Pub. No.: 2000-186046 [JP 2000186046 A]

Published: July 04, 2000 (20000704)

Inventor: KOTAKE SHIGERU
UDAGAWA NOBUYUKI
SUDA TATSUO

Applicant: SNOW BRAND MILK PROD CO LTD
SANKYO CO LTD

Application No.: 11-292644 [JP 99292644]

Filed: October 14, 1999 (19991014)

Priority: 10-307895 [JP 98307895], JP (Japan), October 14, 1998 (19981014)

International Class: A61K-045/00; A61K-038/22; A61K-039/395; A61P-029/00

ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject therapeutic agent useful for treatment of chronic rheumatism by adding a material for inhibiting or neutralizing specific interleukin activities, or a material for inhibiting signal transduction of osteoclastogenesis of the above interleukin.

SOLUTION: This therapeutic agent for chronic rheumatism contains (A) a material for inhibiting or neutralizing the activities of interleukin-17, preferably interleukin-17 neutralizing antibody, and/or (B) a material for inhibiting signal transduction of osteoclastogenesis of the interleukin-17, preferably osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF) as an active ingredient. The dosage of the therapeutic agent is preferably carried out by once or twice administrations of 0.05-500 mg dose per 30 days. Preferably, the dosage of the OCIF is carried out by one to several times administration of 0.01-100 mg dose, and in the case of a sustained release preparation, the dosage is carried out by once or twice administrations per seven to 15 days.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2001 JPO & JAPIO. All rights reserved.

1/34/3 (Item 1 from file: 351)

013379641

WPI Acc No: 2000-551579/200051

Therapeutic agent for preventing and treating bone joint destruction in rheumatoid arthritis, comprises interleukin-17 inhibitor and/or osteoclast formation signal transmitter of interleukin-17

Patent Assignee: SANKYO CO LTD (SANY); SNOW BRAND MILK PROD CO LTD (SNOW)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2000186046	A	20000704	JP 99292644	A	19991014	200C51 B

Priority Applications (No Type Date): JP 98307895 A 19981014

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2000186046	A	10	A61K-045/00	

Abstract (Basic): JP 2000186046 A

NOVELTY - Therapeutic agent for rheumatoid arthritis comprises a substance which inhibits or neutralizes the activity of interleukin-17 (IL-17) and/or which inhibits osteoclast formation and signal transmittance of IL-17 as active ingredient.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) diagnostic method for rheumatoid arthritis involves measuring the content of IL-17 in the collected blood or synovial fluid and diagnosing the illness by the numerical value; and

(2) screening for the substance which inhibits osteoclast formation and signal transmittance of IL-17 involves cultivating an osteoclast or osteoclast like stromal cell and a myeloid cell, screening and differentiating the indicator substance which inhibits or neutralizes IL-17 activity.

ACTIVITY - Antirheumatic; antiarthritic.

No test details for the above mentioned activities are given in the specification.

MECHANISM OF ACTION - Inhibits IL-17 and osteoclast formation. In vitro osteoclast formation and induction activity of IL-17 in a primary culture of osteoclast obtained from neonate mouse which was cultivated with myeloid cell was implemented as described in Udagawa et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87, 7260-7264(1990). The osteoclast formation was evaluated by carrying out TRAP coloring and measuring the number of TRAP+ osteoclast after fixing the adhesion cell. The osteoclast formation activity was demonstrated at lower concentrations (0.01-10 ng/ml), showed higher value of osteoclast formation activity and showed enhanced bone resorption.

USE - The agent is useful for screening and diagnosing rheumatoid arthritis (claimed) useful in preventing and treating bone joint destruction.

ADVANTAGE - The screening method is useful for screening the activity of rheumatoid arthritis drugs.

pp; 10 DwgNo 0/6

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - PHARMACEUTICALS - Preferred Agent: The therapeutic agent comprises IL-17 neutralizing antibody as IL-17 inhibitor and osteoclast formation repressor (osteoclastogenesis inhibitory factor OCIF) as inhibitor for osteoclast formation and signal transmittance of IL-17.

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): A61K-045/00

International Patent Class (Additional): A61K-038/22; A61K-039/395;

A61P-029/00

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-186046

(P2000-186046A)

(43) 公開日 平成12年7月4日 (2000.7.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	
38/22		39/395	D
39/395			U
A 6 1 P 29/00	1 0 1	A 6 1 P 29/00	1 0 1
		A 6 1 K 37/24	
		審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)	

(21) 出願番号	特願平11-292644	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号
(22) 出願日	平成11年10月14日 (1999. 10. 14)	(71) 出願人	000001856 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 5 番 1 号
(31) 優先権主張番号	特願平10-307895	(72) 発明者	小竹 茂 東京都小平市上水南町 2-2-14
(32) 優先日	平成10年10月14日 (1998. 10. 14)	(72) 発明者	宇田川 信之 千葉県柏市明原 3-16-7
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	須田 立雄 東京都立川市若葉町 1-8-5
		(74) 代理人	.100090941 弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 慢性関節リウマチ治療剤及び診断方法

(57) 【要約】

【課題】 慢性関節リウマチ治療剤及び診断方法の提供。

【解決手段】 生体中のインターロイキン-17 (IL-17) の活性を抑制または中和する物質及び／又は IL-17 による破骨細胞の形成誘導シグナル伝達を阻害する物質を有効成分とする慢性関節リウマチ (RA) 治療剤。血液又は関節液中の IL-17 含量を測定することによる慢性関節リウマチ診断方法。骨芽細胞又は骨芽細胞様ストローマ細胞と骨髄細胞の共培養系において破骨細胞への分化抑制を指標とする IL-17 活性の抑制または中和する物質及び／又は IL-17 による破骨細胞の形成誘導シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングする方法。

【効果】 RA 等における関節骨破壊の予防及び治療に用いる医薬として、RA の診断方法、または、RA の予防または治療に有効な物質を探索するためのスクリーニング方法として有用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターロイキン-17の活性を抑制または中和する物質及び／又はインターロイキン-17の破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質を有効成分とすることを特徴とする慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項2】 インターロイキン-17の活性を中和する物質としてインターロイキン-17中和抗体を用いる請求項1記載の治療剤。

【請求項3】 インターロイキン-17の破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質として破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF)を用いる請求項1記載の治療剤。

【請求項4】 採取した血液または関節液中のインターロイキン-17の含量を測定してその数値により慢性関節リウマチ疾病を診断することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。

【請求項5】 骨芽細胞又は骨芽細胞様ストローマ細胞と骨髓細胞との共培養系において破骨細胞への分化抑制を指標として、インターロイキン-17活性を抑制または中和する物質及び／又はインターロイキン-17の破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングすることを特徴とするインターロイキン-17の破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、インターロイキン-17の活性を抑制する物質等を有効成分とする新規な慢性関節リウマチ治療剤、血中又は関節液中のインターロイキン-17を測定する慢性関節リウマチ診断方法、及び骨芽細胞等と骨髓細胞との共培養系を用いて前記有効成分となる物質をスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性関節リウマチ（以下RA）は多関節における滑膜の増殖を特徴とし、経時的に関節及び骨の変形・破壊が起こる全身性の慢性炎症性疾患である。RAの原因は未だに不明であるものの、その病態形成において多くのサイトカインが関与しており、その中でもインターロイキン（IL-1）、IL-6、tumor necrosis factor- α （TNF- α ）といった炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが知られている。抗リウマチ薬がRAの治療に用いられており、その中には狭義の抗リウマチ薬と免疫抑制薬がある。狭義の抗リウマチ薬としては、例えば、経口金剤、SH基を有するD-ペニシラミンとブシラミン、ロベンザリット二ナトリウム、サラゾスルファピリジン、アクタリット等が挙げられる。又、免疫抑制薬としては、例えば、メトトレキサートやミゾリビンがあり、これらは広義の抗リウマチ薬の範疇に入れられている。これら抗リウマチ薬による治療目的は、RAの免疫異常を是正し病気の進展を抑え、骨破壊、ひいては機能障害を防ぐことである。このように臨床において多くの抗

リウマチ薬が使用されているが、いずれの薬剤も副作用を有しており、間質性肺炎、造血、腎臓及び肝臓障害等の多くの副作用が報告されている。又、これらの抗リウマチ薬は、痛みや関節炎を抑え、QOL(quality of life)の向上をはかることはできるものの、全身的炎症、関節の機能障害（骨破壊）等をくい止めることは困難とされている。副作用が少なく、真にRAの治療、特に関節機能障害（関節骨破壊）の阻止並びに改善等に有効な抗リウマチ薬の開発が望まれている。さらには、RAの正確な診断方法やRAの治療剤をスクリーニングする方法が望まれている。

【0003】RAの病態形成には種々の炎症性サイトカイン、その中でもIL-1、IL-6及びTNF- α といったサイトカインが重要な役割を果たしているが、特に代表的な炎症性サイトカインであるIL-6については、IL-6によるシグナル伝達阻害を介したRAの治療が試みられている。IL-6のシグナル伝達を阻害する方法として、①IL-6の産生を抑制する、②IL-6を中和する、③IL-6とIL-6受容体との結合を阻害する、④IL-6/IL-6受容体とgp130との結合を阻害する等の方法が考えられている。具体的にIL-6のシグナル伝達を阻害する方法として、ヒト型化抗IL-6受容体抗体によるRAの治療が試みられ、ヒト型化抗IL-6受容体抗体によるRA治療の可能性が示唆されている。またヒト型化抗IL-6受容体抗体は、IL-6による破骨細胞形成促進並びに活性化を阻害すると考えられることから、関節病変の進行を抑えることが期待されている。

【0004】近年、インターロイキン-17（以下IL-17）が発見されその機能が探索されている（臨床免疫、29、678-682（1997））。IL-17は滑膜由来の線維芽細胞に対してIL-6やIL-8、G-CSFなどの炎症性サイトカインの産生誘導をおこすとともに、成熟好中球の分化誘導を引き起こす事が知られている。そして最近になり、炎症性の疾患にIL-17が関与しているのではないかと推測がなされている。しかしながら、IL-17はT細胞由来の新規なサイトカインであり、RAの病態形成におけるIL-17の関与は明らかにされていない。又、後述するようにIL-6を始めとする炎症性サイトカインの多くは、gp130を介するシグナル伝達により破骨細胞形成の促進活性を有し、骨吸収亢進作用を有することが知られているが、IL-17については破骨細胞形成におけるその役割については、殆ど解明されていない。

【0005】一方、破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF)はヒト正常胎児肺由来線維芽細胞IMR-90(ATCC CCL-186)の培養液中にin vitro破骨細胞形成を特異的に抑制する因子として見い出され、その培養液から精製、純化されたサイトカインである(WO 96/26217号; Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, 137-142 (1997))。更に、純化されたOCIF蛋白質の内部アミノ酸配列が決定され(Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, 137-

142 (1997))、そのアミノ酸配列を基に合成されたDNAをプローブとして、IMR-90のcDNAライブラリーからヒトOCIF cDNA がクローニングされた。このヒトOCIF cDNAを動物細胞用発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを動物細胞に形質導入して得られた形質転換細胞を培養し、その培養液から遺伝子組み換えヒトOCIFが得られている(W096/26217号)。遺伝子組み換えOCIF (rOCIF)の投与は不動物化ラットや卵巣摘出ラットにおいて、顕著な骨密度並びに骨強度の改善(W096/26217, Simonet et al.: Cell 89, 309-319, 1997)を、また正常ラットへの投与においても、破骨細胞数の減少を伴い、顕著な骨密度及び骨容量の増加をもたらすことが示されている(Yasuda et al.: Endocrinology, 139, 1329-1337, (1998))。OCIFは、単量体(モノマー型)及び二量体(ホモダイマー型)として自然界に存在する。モノマー型OCIFの分子量は、還元、非還元下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で約60kDであり、ホモダイマー型OCIFの分子量は、非還元下でのSDS-PAGEで約120kD、また還元下でのSDS-PAGEでは約60kDである。ヒトOCIF及びマウスOCIFとも380個のアミノ酸からなり、両者間のホモロジーは86%である。ホモダイマー型OCIFはC-末端から2個目のシステイン残基による分子間ジスルフィド結合により形成されている(Yamaguchi et al.: J. Biol. Chem. 273, 5117-5123, (1998))。in vitroでの破骨細胞形成抑制における比活性は、モノマー型とホモダイマー型OCIF間には差異はなく同等である。OCIFはN-末端領域に4つのシステインリッチなドメインが存在し、その構造類似性からOCIFはTNF レセプター(TNFR)ファミリーに属する膜貫通(トランスメンブラン、TM)領域を持たない可溶性の新規なメンバーである。又、OCIFのC-末端領域にはTNFRファミリーであるFas、TNFR-1に見られるアポトーシスを誘導する領域(デスドメイン、DD)とホモロジーのあるDD homologous region (DHH)が2箇所存在する。さらにC-末端側には、ヘパリン親和性を示す領域が存在する(Yamaguchi et al.: J. Biol. Chem. 273, 5117-5123 (1998))。

【0006】RAは関節滑膜を主病変とする難治性の炎症性疾患である。RAにおける骨障害は①罹患関節に生じる骨破壊、②疾患活動初期より出現する罹患関節周囲の骨粗鬆症、③RAの病変の進行に伴い徐々に顕在化する全身性骨粗鬆症に分類される。特に、罹患関節周囲の骨粗鬆症は本疾患の早期から発症しはじめ、骨塩量も他の部位よりも早く減少することが知られている。RAは全身性の慢性炎症性疾患であり、その治療には抗炎症剤等を主体とする多くの抗リウマチ薬が使用されている。これらの抗リウマチ薬は前述したように多岐にわたる副作用を有し、またRAにおける骨破壊をくい止めることは困難とされている。RAの原因は未だに不明であるが、その病態形成において多くの炎症性サイトカインが関与しており、その中でもインターロイキン-1(IL-1)、IL-6、TNF- α

といった炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが示されている。このことは、関節液中のIL-6の濃度はRAと類似の関節症状を呈する変形性関節症に比べ高値を示す(Hirano, T. et al.: Eur. J. Immunol., 18, 1797-1801, (1988))ことから示唆されている。実際に、より有効で副作用の少ない治療薬の開発に向け、これら個々の炎症性サイトカインの作用を中和するヒト型化抗体あるいはこれらの炎症性サイトカイン受容体に対するヒト型化抗体によるサイトカインシグナル伝達阻害を介したRAの治療が試みられている。

【0007】一方、骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の統合された活性に依存している。骨形成と骨吸収の均衡が崩れることにより骨代謝異常が発生すると考えられている。骨代謝の異常を伴う疾患として骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、腎性骨異常症、RA、及び変形性関節症等が知られている。特に、RAにおける関節骨破壊は、異常に亢進した骨吸収により起こるとされている。骨吸収の亢進は、骨吸収を担当する破骨細胞の形成並びに骨吸収活性の促進により起こると考えられる。従って、RAにおける関節骨破壊の阻止及び/又は治療には、この異常に亢進した骨吸収を特異的に抑制すること、即ち破骨細胞形成を阻害(抑制)すること、及び/又は破骨細胞の骨吸収活性を阻害(抑制)することであり、そのような作用を有する物質は副作用の少ない、またより有効な抗リウマチ薬として期待される。

【0008】骨代謝を担当する細胞は骨芽細胞と破骨細胞であり、これらの細胞は互いに密接に相互作用しており、この現象はカップリングと呼ばれている。骨芽細胞/骨芽細胞様ストローマ細胞は、破骨細胞前駆細胞や成熟破骨細胞との細胞間接着により、それぞれ破骨細胞の分化、成熟や成熟破骨細胞による骨吸収活性を制御していることが知られている。骨芽細胞/骨芽細胞様ストローマ細胞は、各種骨吸収因子による3つの異なるシグナル伝達系、即ち活性型ビタミンD₃は核内のD₃レセプター、インターロイキン-1(IL-1)、副甲状腺ホルモン(PTH)やプロスタグランジンE₂(PGE₂)等はprotein kinase A、及び炎症性サイトカインであるIL-6、可溶性IL-6受容体、IL-11、白血病阻害因子(LIF)及びオンコスタチンM等はgp130を介したシグナルを受けることにより、破骨細胞分化誘導因子(osteoclastogenesis differentiation factor, ODF)を細胞膜上に発現するという仮説が提唱されている(Suda et al.: Endocrine Rev. 13, 66-80 (1992); Suda et al.: Bone 17, 87S-91S (1995))。上述したように、OCIFはTNF レセプターに属する可溶性レセプターであり、活性ビタミンD₃処理したマウス骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2細胞に特異的に結合することが明らかにされた(Yasuda et al.: Endocrinology, 139, 1329-1337 (1998))。

【0009】又、¹²⁵I標識OCIFを用いた発現クローニン

グによりその膜上に発現するOCIF結合分子(OCIF binding molecule, OBM)のcDNAがクローニングされた(Yasuda et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3597-3602 (1998))。このOCIF結合分子、OBMは膜結合型蛋白質であり、その生物活性試験の結果からOBMは破骨細胞分化誘導因子(ODF)としての活性を有することが明らかにされている。(Yasuda et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3597-3602 (1998))。即ち、OBMは上述したように炎症性サイトカインを含む種々の骨吸収因子による3つの異なるシグナル伝達により骨芽細胞/骨芽細胞様ストロマ細胞上に発現する破骨細胞分化誘導因子(破骨細胞形成促進因子)であり、OCIFはこのOBMに結合することにより破骨細胞形成抑制作用を発揮するというOCIFの作用機序が明らかにされた(Yasuda et al.: Endocrinology, 139, 1329-1337 (1998); Yasuda et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3597-3602 (1998))。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】IL-17はT細胞由来の新規なサイトカインであるが、破骨細胞形成におけるその役割は殆ど解明されていない。本発明者らは、IL-17とRA病態に重大な関係があることを見いだした。本発明者らはさらに検討を進めた結果、IL-17の活性の抑制及び/又はシグナル伝達の抑制がRAの治療につながる事、及びOCIFの薬理効果の一つに、IL-17活性の抑制又は中和及び/又はIL-17による破骨細胞形成誘導シグナル伝達阻害にあることを見いだして本発明を完成するに至った。そして、血液または関節液中のIL-17の含量を測定すると、その含量に応じてRAが変形性関節症、外傷あるいは痛風等と峻別できることを見出した。さらに、骨芽細胞等と骨髄細胞との共培養系において破骨細胞への分化抑制を指標とするとIL-17の活性を抑制又は中和する物質あるいはIL-17の破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングする方法を見出した。従って本発明の課題は、生体中のIL-17の活性を抑制または中和する物質及び/又はIL-17による破骨細胞形成誘導シグナル伝達を阻害する物質を有効成分とするRA治療剤を提供することにある。また、本発明の課題は、血液又は関節液中のIL-17を測定してRAを診断する方法を提供することにある。さらに本発明の課題は、IL-17活性を抑制または中和する物質及び/又はIL-17の破骨細胞形成誘導シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングする方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、生体中のIL-17の活性を抑制または中和する物質及び/又はIL-17の破骨細胞形成誘導シグナル伝達を阻害する物質を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤に関する。より具体的には、このような物質としてはインターロイキン-17の活性を中和する物質としてインターロイキン-17中和抗

体を挙げることができ、また、インターロイキン-17の破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質として破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF)を挙げるができる。また、本発明は、採取した血液又は関節液中のインターロイキン-17の含量を測定してその数値により慢性関節リウマチを診断する慢性関節リウマチ診断方法に関する。さらに、本発明は、骨芽細胞又は骨芽細胞様ストロマ細胞と骨髄細胞の共培養系において破骨細胞への分化抑制を指標として、インターロイキン-17活性を抑制または中和する物質及び/又はIL-17による破骨細胞の形成誘導シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングする方法に関する。本発明は、RA等、疾病における関節骨破壊の予防及び治療に用いる医薬として、またRAの診断、あるいはRAに有効な物質を探索するためのスクリーニングに用いることができる。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明者らの研究によれば、下記実施例に示すように、関節滑液中のIL-17レベルが変形関節症患者においてよりもRA患者において有意に($p < 0.001$)高値を示すことを見出した。又、RA患者由来の滑液組織中のCD4⁺、CD45RO⁺ T細胞にIL-17陽性細胞が存在することも明らかになった。このようにIL-17は、RAの病態形成に深く関与していることが示唆された。そこで、本発明者らはIL-17の骨吸収亢進の関与を明らかにすべく、IL-17による破骨細胞形成促進作用について鋭意検討したところ、IL-17がマウス骨髄細胞と初代培養の骨芽細胞との共培養系において、骨髄細胞から多核の破骨細胞形成を顕著に誘導することを見出し、RAの病態形成、特に関節骨破壊に深く関与していることを確認した。以上の結果からIL-17は本病態の診断マーカーとして有用であり、またRA治療薬としてその産生抑制物質あるいはシグナル伝達阻害物質のスクリーニングにおいても有用な指標であることが判明した。さらにまた、以上のことからIL-17の活性を抑制または中和する物質又はIL-17による破骨細胞形成シグナル伝達を阻害する物質は抗リウマチ薬として有望であることが推定された。このような物質である抗IL-17中和抗体又はOCIFが破骨細胞の形成を抑制することが確認できた。とくにOCIFがこのIL-17による顕著な破骨細胞形成誘導を顕著に阻害することを見出した。即ち、これまで知られているRAの病態形成に関与することが知られている上記炎症性サイトカインだけでなく、本発明において見出されたIL-17による破骨細胞形成もOCIFは完全に阻害することが明らかになった。本発明者らは、上記のようにRA患者に顕著にIL-17が増加し、そして増加に伴って破骨細胞の形成が促進されて、骨破壊が促進すること、そしてこのような骨破壊は破骨細胞形成抑制因子(OCIF)によって選択的に抑制されることを初めて見出したのである。

【0013】本発明者らは、上記したようにRA患者の関

関節液中のIL-17 レベルは変形性関節症患者のそれよりも有意に ($p<0.001$) 高値を示し、またIL-17 は顕著な破骨細胞形成誘導活性を通して、骨吸収作用を発揮することからRAにおける関節骨吸収等の病変に深く関与するサイトカインであることを見出した。さらにこの結果から、生体中のIL-17 の活性を抑制するかあるいは又、中和すること及び/又はIL-17 による破骨細胞の形成誘導シグナル伝達を阻害することができれば、RAを治療することが可能であることを見出した。従って、IL-17 の活性抑制又は中和活性を有する物質及び/又はIL-17 による破骨細胞の形成誘導シグナル伝達を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤をRA治療剤とすればRAの治療が可能となる。このような物質としては、上記のプロスタグランジンE₂ (PGE₂) の産生を抑制する物質、PGE₂ によるシグナルの阻害物質、IL-17 を中和する抗体、あるいはIL-17 による破骨細胞の形成誘導シグナル伝達を阻害する破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) のような物質を例示することができ、特に好ましくは、IL-17 中和抗体又はOCIFが用いられる。

【0014】本発明のIL-17 活性を中和する抗体を有効成分とするRA治療剤において、有効成分であるIL-17 中和抗体は、モノクローナル、ポリクローナル抗体のいずれでも使用可能である。またヒト型、マウス型のいずれでも使用可能であるが、好ましくはヒト型化抗ヒトIL-17 モノクローナル抗体が用いられる。抗体の作製は、以下の方法により実施することができる。即ち、IL-17 に対するポリクローナル抗体は、精製IL-17 をウサギやヤギ等に常法により免疫し、得られた抗血清からプロテインAカラム (ファルマシア社) を用いて精製することにより得られる。IL-17 の中和抗体は、滑膜線維芽細胞に対してIL-17 を作用させた時のIL-6の生産抑制を指標として選定することができる。または市販されている中和抗体を使用することができる (R&D System Inc. 製等)。

【0015】又、IL-17 に対するモノクローナル抗体は、以下のようにして作製することができる。即ち、精製IL-17 の投与によりBalb/cマウスを免疫し、マウス脾臓細胞とマウスミエローマとを常法により細胞融合させることによりハイブリドーマを作製し、IL-17 に対する抗体産生ハイブリドーマを選択する。尚、免疫抗原である精製IL-17 は市販のものを使用しても良いし、すでに公知のIL-17 遺伝子を用いて遺伝子組み換え法によって生産しても良い。得られた抗体産生ハイブリドーマを数回 (通常3回程度) クローニングすることにより純化された安定なハイブリドーマを樹立することができる。このようにして樹立された抗体産生ハイブリドーマを培養し、その培養上清からIL-17 に対するモノクローナル抗体をプロテインAカラム (ファルマシア社) により精製することができる。又、ヒト型化抗体は、上述の方法により得られたマウス抗モノクローナル抗体の中からヒト

IL-17 活性を中和する抗体で、しかもヒトIL-17 に対して高い親和性 (出来るだけ低い解離定数、例えば 10^{-10} M 以下) を有するモノクローナル抗体を選別する。

【0016】次いで、得られたマウス抗ヒトIL-17 モノクローナル抗体の抗原認識部位である可変領域 (CDR) すべてを、ヒトIgG の可変領域に移植する方法 (CDR-grafting) によりヒト型化が可能である。又、ヒトの免疫システムをすべてマウスに移植したトランスジェニックマウスに精製ヒトIL-17 を投与し、免疫する。免疫された同マウスの脾臓細胞とマウスミエローマとを上記したように、常法により細胞融合させ、ハイブリドーマを作製する。抗体産生ハイブリドーマの培養液をプロテインAカラムにより精製することにより、完全なヒト型抗ヒトIL-17 モノクローナル抗体を得ることができる。得られたヒト型モノクローナル抗体の中から、ヒトIL-17 活性を中和し、またヒトIL-17 に高親和性を示す抗体を選択することにより、本発明の目的とするヒト型抗ヒトIL-17 モノクローナル抗体を得ることができる。このようにして得られたヒトIL-17 の活性を中和するヒト型抗ヒトIL-17 モノクローナル抗体は、RA治療剤として用いることができる。免疫原として使用するヒトIL-17 は、公知の遺伝子 (Rouvier, E. et al., J. Immunol., 150, 5445 (1993)) から遺伝子組み換え法によって生産してもよいし、市販されている精製IL-17 を使用することもできる。

【0017】本発明のOCIFを有効成分とするRA治療剤において、OCIFは医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができる。OCIFの調製方法としては、例えばOCIFを生産する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清から分離精製してOCIFを得る方法 (W096/26217号; Tsuda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, 137-142 (1997))、遺伝子工学的手法によりOCIFをコードする遺伝子を適当なベクターに組み込み、これを適当な宿主に導入して形質転換細胞株を構築し、その形質転換細胞株の培養上清から目的とする組み換えOCIFを得る方法 (W096/26217号; W096/20621号; Simonet et al.: Cell 89, 309-319, 1997) などが挙げられる。OCIFを初代培養細胞あるいは株化細胞の培養上清から精製する具体的方法としては、例えば、S-セファロースやヘパリンセファロースを用いたクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相カラムを用いたHPLCなど、通常の蛋白質精製法にて精製することができる (Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, 137-142 (1997))。

【0018】又、遺伝子組み換え法を用い、ヒトOCIFのアミノ酸配列をコードする遺伝子をSR- α やCMV プロモーターを含む動物細胞用発現ベクターに挿入し、これを従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞など、好ましくは動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ナマルバ細胞、マウスC1

27細胞、サルCOS細胞などに導入し、得られた形質転換細胞の培養液から同様に精製することができる。このようにして得られたOCIFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されたり、他のアミノ酸配列が一部挿入された変異体や活性に必須のN-末端領域に存在する4つのシステインに富むドメインが保存され、C-末端領域全てが他の蛋白質分子、例えばイムノグロブリンのFcなどで置換された変異体であってもよい。このようにして得られたOCIFなどを含有する薬剤、即ち本発明の薬剤は、慢性リウマチにおける関節骨破壊の予防及び／又は治療剤として用いることができる。とくにOCIFはIL-17による関節骨の破壊の抑制以外にIL-1、IL-6、TNF- α による破骨細胞形成分化誘導シグナル伝達を抑制することから、より広範囲な炎症性のRAに有効である。

【0019】本発明のRA治療剤は、医薬としてヒトあるいは動物に対し安全に、経口的あるいは非経口的に投与される。非経口的に投与する場合、例えば注射剤は常法により調製することができる。ヒトIL-17中和抗体あるいはOCIFを注射剤とする場合には、滅菌水、緩衝液、生理食塩水などの適当な溶媒に溶解した後、フィルターなどで濾過して滅菌し、次いで無菌容器に充填することにより調製することができる。注射剤中の抗体含量としては、通常0.001~20 w/v%程度、一方OCIF含量としては、通常0.0001~5 w/v%程度、好ましくは0.001~1 w/v%程度に調製される。有効成分としてOCIFまたは抗体を用いる場合には、製剤中の抗体あるいはOCIF含量は、剤形あるいは適用疾患などに応じ、適宜調整することができる。製剤化に際して、好ましくは安定剤及び吸着防止剤が添加される。安定剤としては、例えばアルブミン、ゼラチン、マンニトール及びソルビトールなどの糖アルコール、グリシン及びアラニン等のアミノ酸、グルコース、デキストラン、ポリエチレングリコールなどが用いられる。又、吸着防止剤としては、アルブミン、ゼラチンやポリソルベート20及び80などの非イオン界面活性剤などが用いられる。液状製剤は、凍結保存するか又は凍結乾燥などにより、水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。本発明のRA治療剤は、その適用疾患の病態に応じた剤形により、適当な投与経路により投与される。例えば、注射剤は静脈、皮下、筋肉内、また本剤適用症の特徴である関節骨破壊の予防及び／又は治療においては、関節腔内に投与することができる。その際の投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整されるが、通常ヒト型抗体は半減期が極めて長い(20日前後)ので、0.05~500 mgを30日間に1~2回程度投与すればよい。一方、OCIFに関してはその投与量として0.01~100 mgを1日1回ないし数回に分けて投与するか、あるいは徐放化製剤として7~15日間に1又は2回程度投与すればよい。又、本発明の治療剤を

経口的に投与する場合には、例えば錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟又は硬カプセル剤、液剤、乳剤、シロップ剤などに製剤化され、これらの製剤は常法に従って調製することができる。

【0020】本発明において、採取した血液又は関節液中のIL-17含量を測定することによってRAの診断を行うことができる。通常2ng/ml以上であれば評価上陽性と判断できる。IL-17含量を測定するためには、IL-17の抗体を使用した酵素免疫測定キット(ELISA)やラジオイムノアッセイキット(RIA)を用いることができる。IL-17測定試薬に用いるIL-17抗体は、ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体のいずれも使用することができる。抗体は前述の方法により作製することができる。これらのIL-17に対するポリクローナル抗体-ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体-モノクローナル抗体、モノクローナル抗体-モノクローナル抗体の組み合わせにより、ELISAあるいはRIAを構築することにより、ヒト血清及び関節液中のIL-17含量を高感度で測定することができる。RA患者は特異的に血清及び関節液中のIL-17が増加しており、RA患者と診断上区別しがたい変形関節症の患者を明確に区別可能である。

【0021】上記のように、IL-17による破骨細胞形成は、IL-17が骨芽細胞/骨芽細胞様ストローマ細胞に作用し、プロスタグランジンE₂(PGE₂)を産生し、このPGE₂によるシグナルをprotein kinase Aを介して再び骨芽細胞/骨芽細胞様ストローマ細胞が受け取り、その細胞表面に破骨細胞形成分化誘導因子、OBMを発現し、破骨細胞形成を促進させる。従って、骨芽細胞又は骨芽細胞様ストローマ細胞と骨髄細胞の共培養系において、破骨細胞への分化抑制を指標として、IL-17活性の抑制または中和する物質及び又はIL-17による破骨細胞形成誘導シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングすることが可能である。具体的には、新生児マウスの頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞とマウス骨髄細胞、あるいはマウス脾臓細胞とマウス骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2との共培養系におけるIL-17による破骨細胞形成誘導活性(酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性:TRAP活性、又はカルシトニン受容体の発現)を指標とし、この培養系に被検物質を添加して培養を行い、上記のTRAP活性、又はカルシトニン受容体の発現を測定するか、より直接的には破骨細胞の形成を観察して、目的のIL-17活性を中和または、抑制する物質、及び又はIL-17による破骨細胞形成誘導シグナル伝達を阻害する物質をスクリーニングすることができる。尚、TRAP活性及びカルシトニン受容体の発現は、いずれも市販のイムノアッセイキット並びに¹²⁵I標識サケカルシトニン(Amersham製)を用いて容易に高感度測定が可能である。このスクリーニング系で陽性を示す物質は、IL-17活性を阻害、IL-17による骨芽細胞/骨芽細胞様ストローマ細胞株への破骨細胞形成促進活性シグナルを阻害する物質、あるいはPGE₂産生

を阻害する物質が検出される。

【0022】

【実施例】以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【0023】

【実施例1】IL-17の活性を中和するポリクローナル抗体による破骨細胞形成抑制

IL-17の活性を中和するポリクローナル抗体のIL-17によるin vitro破骨細胞形成誘導活性に及ぼす効果を、実施例5と同様の方法により調べた。即ち、骨芽細胞と骨髓細胞との共培養系において、破骨細胞形成誘導因子としてIL-17 (1 ng/ml、遺伝子組み換え品、PeproTech社製)、活性ビタミンD₃ (1 α , 25(OH)₂D₃, 10⁻⁸ M、和光純薬社製)、PTH (200 ng/ml、旭化成社製)、あるいはIL-1 β (10 ng/ml、Genzyme社製)を添加し、IL-17添加培養系には、IL-17(遺伝子組換え品 Pepro Tech社製)によって免疫したヤギ血清より得たIL-17に対するポリクローナル中和抗体を2.5 μ g/ml、また活性ビタミンD₃、PTH、あるいはPGE₂の添加培養系には5 μ g/mlのIL-17に対するポリクローナル中和抗体を添加した。破骨細胞形成は、6日間培養後に各well中の接着細胞を固定後、TRAP染色しTRAP陽性破骨細胞数を計測することにより評価した。TRAP染色に際しては、接着細胞を10%ホルムアルデヒドで3分間固定し、各wellの表面を風乾させ、次いで基質として0.01% AS-MSリン酸塩(Sigma社)及び50mMの酒石酸ナトリウム存在中での反応生成物に対する色素として0.03% red violet LB塩を含む酢酸バッファー中、室温で10分間インキュベートした。TRAP細胞は黒っぽい赤色として出現する。3つ以上の核を含むTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として計数した。個々の実験を4回繰り返し実施し、得られた結果を図1に示す。又、これらの細胞が破骨細胞であることを確認するために、カルシトニン受容体の発現を¹²⁵I標識したサケカルシトニン(Amersham社製)を用いて、Udagawaらの方法(Udagawa et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 7260-7264 (1990))によるオートラジオグラフィーで確認したところ、破骨細胞であることが確認された。この結果、IL-17に対するポリクローナル中和抗体はIL-17による破骨細胞形成誘導活性を特異的に阻害することが明らかになった。この結果から明らかなように、IL-17に対するポリクローナル中和抗体は、RAの関節滑液中に高値に存在するIL-17による関節骨吸収を抑制し、RA治療薬として有用である。

【0024】

【実施例2】OCIFによる破骨細胞形成抑制

OCIFのIL-17によるin vitro破骨細胞形成誘導活性に及ぼす効果を、実施例1と同様の方法により調べた。即ち、骨芽細胞と骨髓細胞との共培養系において、破骨細胞形成誘導因子としてIL-17 (1 ng/ml)存在下で、OCIFを

1.5~50 ng/ml濃度になるように添加し6日間培養した。培養終了後、TRAP陽性多核細胞(破骨細胞)数を計測した。各実験を4回繰り返し実施し得られた結果を、図2に示す。この結果、IL-17による破骨細胞形成をOCIFは用量依存的に抑制し、25 ng/mlの濃度でほぼ完全に破骨細胞形成を阻害することが明らかになった。

【0025】IL-1 β 、IL-6及びIL-11等の炎症性サイトカインや活性ビタミンD₃、PTH、PGE₂等を含む既知の骨吸収因子は3つの異なるシグナル伝達系を介して、骨芽細胞/骨芽細胞様ストローマ細胞にそれらのシグナルが伝わり、その細胞表面に破骨細胞形成分化誘導活性を有するOCIF結合分子(OCIF binding molecule, OBM)を発現することがすでに明らかにされている(Yasuda et al.: Endocrinology, 139, 1329-1337 (1998))。本発明において新たに明らかになった、IL-17による破骨細胞形成もOCIFにより完全に抑制されることから、本発明者らはIL-17刺激によっても骨芽細胞上にOBMが発現誘導されるかどうか調べた。又、OCIFの発現誘導の有無及び対照としての β -Actinの誘導の有無を確認した。種々の濃度のIL-7、NS398 (10⁻⁸ M)、IL-1 β (1 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml)あるいは活性ビタミンD₃ (10⁻⁸ M)の存在下あるいは非存在下でマウス骨芽細胞を3日間培養した。培養後、同細胞からのtotal RNA 20 μ g及びアプローブとしてOBM cDNAを用いてNorthern blot解析を行った。結果を図3に示す。OBMのみ特異的に誘導された。この結果、すでに明らかにされている骨吸収因子であるIL-1 β 、TNF- α 及び活性型ビタミンD₃と同様に、IL-17は骨芽細胞に作用し、濃度依存的にOBMの遺伝子発現を促進することが明らかになった。又、OCIFの誘導は、これらの骨吸収因子の存在とは無関係であった。この結果、OCIFによるIL-17誘導破骨細胞形成の阻害は、IL-17により骨芽細胞上に発現誘導されるOBMにOCIFが結合することにより、OBMによる破骨細胞形成シグナルをブロックすることによるものであることが明らかになった。以上の結果から、OCIFはIL-17をはじめRAの病態形成に深く関与することが知られているすべてのサイトカインによる破骨細胞形成促進作用、即ち骨吸収作用を完全に抑制することが明らかになった。特にOCIFはRAの関節滑液中に高値に存在するIL-17に対する破骨細胞形成を抑制することからRA治療に有用である。さらに、OCIFは破骨細胞形成抑制因子として高い特異性を有するサイトカインであることが認められており、極めて低毒性であるから(Yasuda et al.: Endocrinology, 139, 1329-1337 (1998); Mizuno et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 247, 610-615 (1998))、極めて安全でかつ有効性の高いRAの治療薬、特に関節における骨吸収抑制薬として有望である。

【0026】

【実施例3】OCIF含有製剤の製造

本発明薬剤には、IL-17活性を中和する抗体及びOCIFの

2つがあるが、一般的に治療目的のための抗体の投与量はホルモンやサイトカインの投与量に比べ比較的に高く、また蛋白質としての安定性も優れている。このため、公知の製剤方法を採用しても何ら問題が生じない。従って、製剤の製造における実施例についてはOCIF製剤化を主として例示する。勿論、抗体を有効成分とする製剤についても本実施例のOCIFの製剤化に準じて同様に実施することができる。OCIFの製剤化に用いた物質は遺伝子組み換え品を使用した。

製剤例1

生理食塩水100ml 中にOCIF 1mg、ソルビトール1g 及びポリソルベート80 10mgを含む溶液を滅菌ろ過し、1ml ずつ滅菌バイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0027】製剤例2

10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に食塩876.6 mg、OCIF 1mg 及び低分子ゼラチン100mg を溶解した後、同緩衝液で100 mlに調整する。滅菌ろ過後、1ml ずつ滅菌バイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0028】製剤例3

注射用生理食塩水100ml 中にOCIF 1mg、マンニトール2g、ポリソルベート80 10mgを含む溶液を滅菌ろ過し、1ml ずつ滅菌バイアルに分注した後、凍結乾燥することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0029】製剤例4

生理食塩水100 ml中にOCIF 1mg、グリシン2g、ポリソルベート80 10mgを含む溶液を滅菌ろ過し、1ml ずつ滅菌バイアルに分注した後、凍結乾燥することにより凍結乾燥製剤を得た。

【0030】

【実施例4】RA患者、変形性関節症患者、外傷患者及び痛風患者の関節滑液中のIL-17 の測定

RA患者 43 名 (男女合わせて)、対照患者として9名の変形性関節症(OA)患者、4名の外傷(Tr)患者、及び7名の痛風(G)患者からの関節滑液中のIL-17 濃度を測定した。関節滑液中のIL-17 量はELISA キット (Boisource International社)を用い、添付されているプロトコールに従い測定した。結果を図4 に示す。この結果、関節滑液中のIL-17 レベルは、RAで高値の患者が多く、RAとOAの患者間に有意な ($p<0.001$) 差異が認められた。

【0031】

【実施例5】IL-17 のin vitro破骨細胞形成誘導活性
新生児マウスから得られた頭蓋骨 (20から30個) を0.1% コラーゲナーゼ及び0.2% ディスパーゼを用い、順序よく5回消化することにより初代培養骨芽細胞を調製した。一方、マウス骨髓細胞は成熟マウスから得た。骨芽細胞と骨髓細胞との共培養はUdagawa らの方法 (Udagawa et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7260-7264(1990))により実施した。即ち、48-well プレートを用い、

初代培養骨芽細胞 (2×10^4 cells/well) と骨髓細胞 (5×10^5 cells/well) とを10%牛血清 (FBS, JRH Bioscience 社製) 及び被験物質を含む α -MEM (GIBCO BRAL 社製) 0.3 ml 中で共培養した。IL-17 を含む各被験物質について4つの培養ウェルを用い、また培養は3日目に新鮮培地で培地交換した。破骨細胞形成は、6~7日間培養後に各well中の接着細胞を固定後、TRAP染色しTRAP陽性破骨細胞数を計測することにより評価した。TRAP染色に際しては、接着細胞を10%ホルムアルデヒドで30分間固定し、各wellの表面を風乾させ、次いで基質として0.01% AS-MSリン酸塩 (Sigma 社) 及び50 mM の酒石酸ナトリウム存在中での反応生成物に対する染色色素として0.03% red violet LB塩を含む酢酸バッファー中、室温で10分間インキュベートした。TRAP陽性細胞は黒っぽい赤色として出現する。3つ以上の核を含むTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として計数した。結果を図5に示す。この結果、IL-17 は破骨細胞前駆細胞 (造血細胞) から用量依存的に破骨細胞形成を誘導する活性を有し、0.01~10 ng/mlという低濃度でその活性を発揮することが明らかになった。又、IL-17 により誘導される破骨細胞は象牙切片上で無数の骨吸収窩 (ピット) を形成することから、骨吸収活性を有する成熟破骨細胞であることが認められた。実施例4におけるRA患者関節滑液中のIL-17 の有意な高値並びに本実施例におけるIL-17 による顕著な破骨細胞形成誘導活性、即ち骨吸収亢進活性から明らかのように、IL-17 はRAの病態形成に深く関与していることが示唆された。従って、IL-17 の測定試薬はRAの診断薬として有用である。

【0032】

【実施例6】IL-17によるin vitro破骨細胞形成誘導活性を阻害する物質のスクリーニング
実施例5と同様の方法において、骨芽細胞と骨髓細胞との共培養系に、破骨細胞形成促進因子としてIL-17、活性型ビタミンD₃あるいはPGE₂を加え、更に抗炎症薬としてインドメタシン、あるいはシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2)の特異的阻害剤であるNS398を加えて、6日培養した。IL-17は1ng/mlとなるように、また活性型ビタミンD₃及びPGE₂はそれぞれ 10^{-8} M 及び 10^{-6} M 添加した。又、インドメタシン及びNS398は両者ともそれぞれ 10^{-8} M 添加した。培養6日後、TRAP陽性多核細胞を計数した。各試験は4回実施し、細胞数を平均 \pm SEM として表した。結果を図6に示す。この結果、IL-17 による破骨細胞形成促進作用は、インドメタシンやCox-2 阻害剤で特異的に抑制されることが明らかになった。非ステロイド抗炎症薬はRAの治療に欠かせない存在であり、特にCox-2 の特異的阻害剤は副作用の少ないRA治療薬として期待されている。このように、IL-17 によるin vitro破骨細胞形成の抑制を指標としてスクリーニングを行ったところ、従来RAの治療薬として知られている化合物、あるいは有望と期待されている化合物を容易に、しかも正

しくスクリーニングすることができた。従って本発明は、RA治療薬のスクリーニングシステムとして有用である。

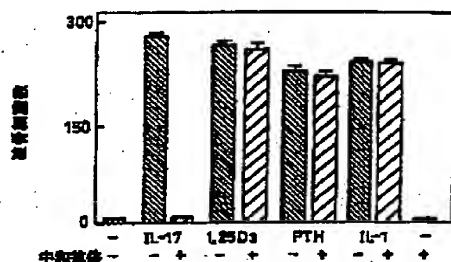
【0033】

【発明の効果】本発明の実施により、生体中のIL-17の活性を抑制または中和する物質、及び／又はIL-17による破骨細胞形成誘導シグナル伝達を阻害する物質を有効成分とするRA治療剤、血中又は関節液中のIL-17を測定することを特徴とするRA診断方法、IL-17により形成される破骨細胞形成系を抑制する物質をスクリーニングする方法が提供される。IL-17はRA診断マーカーとして、またIL-17による破骨細胞形成系を利用したスクリーニング法はRA薬のスクリーニング法として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1のIL-17の活性を中和するポリクロー

【図1】



ナル抗体による破骨細胞形成抑制効果を示す。

【図2】実施例2のOCIFによる濃度依存的破骨細胞形成抑制効果を示す。

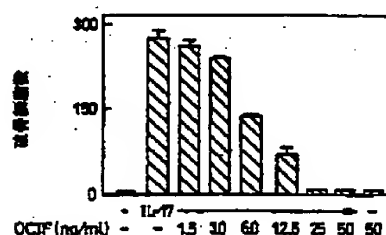
【図3】実施例2の各種破骨細胞形成誘導因子及びIL-17がOBMを発現させることを確認したノーザンブロット解析の結果を示す。

【図4】実施例4のリウマチ患者(RA)、変形性関節症患者(OA)、外傷患者(Tr)、痛風患者(G)の関節液中のIL-17含量をELISA法で測定した結果を表す箱髷図を示す。

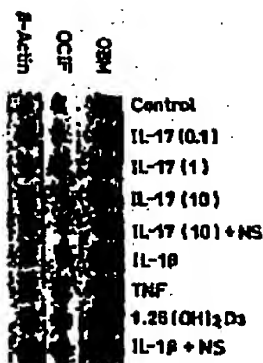
【図5】実施例5の骨芽細胞と骨髄細胞の共培養系において、IL-17により濃度依存的に破骨細胞形成が促進されることを示す。

【図6】実施例6のIL-17によって誘導される破骨細胞形成がNS398及びインドメタシンによって抑制されることを示す。

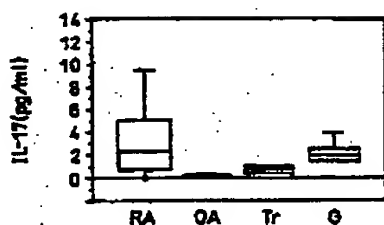
【図2】



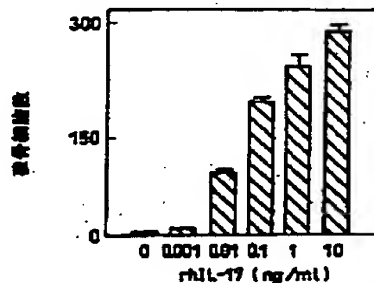
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

